

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
31. Mai 2001 (31.05.2001)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/37858 A1**

PCT

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61K 38/18, A61F 2/30, A61L 27/22
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11735
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
24. November 2000 (24.11.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
199 57 388.3 24. November 1999 (24.11.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): TRANSTISSUE TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Tucholskystr. 2 - Charité, 10117 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (73) Erfinder/Anmelder (nur für US): SITTINGER, Michael [DE/DE]; Karl Marx-Strasse 147 d, 15831 Grossziethen (DE). SCHULTZ, Olaf [DE/DE]; Steinstrasse 10, 10119 Berlin (DE). BURMESTER, Gerd-Rüdiger [DE/DE]; Tullerweg 7, 12277 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: RICKER, Mathias; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, 81679 München (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: IMPLANTABLE SUBSTRATES FOR HEALING CONNECTIVE TISSUE

(54) Bezeichnung: IMPLANTIERBARE SUBSTRATE ZUR HEILUNG VON BINDEGEWEBE

(57) Abstract: The invention relates to an implantable substrate for healing and protecting connective tissue, preferably cartilage, in the case of arthrosis. The invention also relates to systems and auxiliary means for activating stationary mesenchymal cells for regenerating the tissue. Fine connections are produced between the articular space and the bone marrow space. The articular surface is then covered with multi-layer materials which induce growing-in and maturing of cartilage precursor cells of the bone marrow.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein implantierbares Substrat zur Heilung und Protektion von Bindegewebe, vorzugsweise Knorpel, bei Arthrose. Dabei bezieht sie sich auf Systeme und Hilfsmittel zur Aktivierung ortsständiger mesenchymaler Zellen zur Geweberegeneration. Dazu werden zunächst feine Verbindungen zwischen Gelenkraum und Knochenmarkraum hergestellt. Danach wird die Gelenkfläche mit mehrschichtigen Materialien abgedeckt, die ein Einwachsen und Reifen von Knorpelvorläuferzellen aus dem Knochenmark induzieren.

WO 01/37858 A1

BEST AVAILABLE COPY

## IMPLANTIERBARE SUBSTRATE ZUR HEILUNG VON BINDEGEWEBE

5

Die Erfindung betrifft implantierbare Substrate zur Knorpelheilung und -protektion bei Arthrose, genauer gesagt ein implantierbares Substrat zur Heilung und/oder Protektion von Bindegewebe, vorzugsweise Knorpel, umfassend mindestens eine Struktur für die Zelleinwanderung *in vivo* und/oder für die Zellmatrixbildung und/oder für die Freisetzung von Bestandteilen des eingesetzten Mittels und mindestens ein Mittel zur Aktivierung ortsständiger Zellen zur Geweberegeneration, ein Verfahren zu dessen Herstellung, ein Verfahren zur Heilung und/oder Protektion von Bindegewebe, vorzugsweise zur Knorpelheilung und/oder -protektion bei Arthrose, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substrate, sowie deren Verwendung in der operativen Medizin und im Tissue Engineering.

20 Arthrose

Die Osteoarthritis ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit, die Mehrzahl aller Menschen im Alter über 65 sind davon betroffen. Daraus ergibt sich zwangsläufig eine enorme klinische, gesundheitspolitische und volkswirtschaftliche Relevanz für Methoden zur Behandlung der Osteoarthritis. Im Verlauf dieser primär degenerativen altersabhängigen Gelenkerkrankung kommt es zu einer schrittweisen fokalen Zerstörung der Gelenkoberfläche und einem reaktiven fehlregulierten regionalen Wachstum der angrenzenden und subchondralen Knochenstrukturen (Osteophyten). Folge sind Schmerzen und eingeschränkte Funktion und Beweglichkeit. Systemische Faktoren, die die Entstehung einer Osteoarthritis beeinflussen, sind Alter, Geschlecht, Gewicht, Osteoporose, eine familiäre Vorbelastung und mechanische Überbeanspruchung. Lokale Faktoren schliessen die spezifische

Gelenkform, Fehlstellungen, Traumen sowie speziell einwirkende biomechanische Faktoren ein. Trotz der eigentlichen degenerativen Genese kommt es auch bei der Osteoarthrose zu entzündlichen Veränderungen wie einer Synovitis (Entzündung der Gelenkinnenhaut) und Produktion von entzündungsfördernden biologischen Botenstoffen (Zytokinen und Wachstumsfaktoren). Die ablaufenden Veränderungen stellen eine Fehlregulation der Gewebehomöostase im Bereich der lasttragenden Knorpel- und Knochenstrukturen dar, eine Dysbalance zwischen degenerativen und reparativen Prozessen (WB van den Berg: The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis, Z Rheumatol. 58:136-141, 1999).

Die Erkrankung ist dabei Folge von Störungen im Bereich des gesamten Gelenkes einschließlich des Knochens, der Muskulatur und der Gelenkinnervation, die letztlich zu einer mechanischen Überbeanspruchung und biochemisch vermittelten Zerstörung der betroffenen Gelenke führt. Von Bedeutung ist weiterhin, daß es bislang keine Heilung dieser Erkrankung gibt: Physiotherapeutische Maßnahmen und schmerzlindernde, entzündungshemmende Medikamente (nichtsteroidale Antirheumatika) sind häufig unzureichende symptomatische Therapien. Konventionelle orthopädische Verfahren (Debridement, Gelenkshaving, microfracture, drilling) sind ebenfalls nur unzureichend wirksam, bei ausgeprägten Veränderungen bleibt häufig nur der operativ-rekonstruktive Eingriff mit endoprothetischem Gelenkersatz (JA Buckwalter, HJ Mankin: Articular Cartilage Repair and Transplantation: Arthritis & Rheumatism 41:1131-1342, 1998).

#### Knorpelregeneration durch Tissue Engineering mit Zellen und Wachstumsfaktoren

Vielversprechende neue Technologien bietet das Tissue Engineering durch eine Transplantation funktionell aktiver autologer Zellen und ggf. formgebenden Biomaterialien.

Mit Hilfe dieser Technologie wird neues Knorpel- und Knochengewebe aktiv aufgebaut bzw. gezüchtet. Das Tissue Engineering basiert normalerweise auf der Vermehrung autologer Zellen, die anschließend dem Patienten, z.B. in Form einer Lösung oder als ausgereiftes Transplantat, wieder in den Patienten transplantiert werden. Leider ist das Proliferationspotential der Zellen begrenzt, und eine Vermehrung über viele Zellpassagen *in vitro* reduziert wesentlich die funktionale Qualität der Zellen.

Ein weiterer Ansatz im Tissue Engineering besteht darin, die Geweberegeneration insgesamt oder zumindest die Differenzierung von zuvor dem Patienten entnommenen Zellen, z.B. durch Zusatz von Wachstumsfaktoren zu stimulieren. Hierbei sind insbesondere Faktoren der TGF- $\beta$ -Superfamilie interessant, da sie bei der Entwicklung von Geweben und Organen eine zentrale Rolle spielen. Für das Tissue Engineering gibt es dabei sehr verschiedene Prinzipien, diese Faktoren einzusetzen. So können beispielsweise in einen Teil der Zellen Gene der TGF- $\beta$ -Familie eingeschleust werden, um die Ausreifung zu verbessern, aber auch um das Gewebe z.B. in einem chronisch entzündeten Gelenk vor erneuter Zerstörung zu schützen (Evans CH, Robbins PD: Gene therapy for arthritis, Gene therapeutics: Methods and applications of direct gene transfer, Edited by JA Wolff, Boston, Birkhäuser, 321, (1994); Kalden JR, Geiler T, Herrmann M, Bertling W: Gentherapie der rheumatoiden Arthritis - ein bereits anwendbares Therapieprinzip? - Z Rheumatol 57:139-47, (1998); Herndon JH, Robbins PD, Evans CH: Arthritis: is the cure in your genes? J Bone Joint Surg Am, 81:152-7, (1999)).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von Release-Systemen (US 5,910,489), also der vorübergehenden Freisetzung von Faktoren aus resorbierbaren Mikropartikeln oder Zellträgern, um z.B. ein Transplantat während der kritischen Phase der Einheilung zu stabilisieren. Schließlich kann auch die direkte Geweberegeneration ohne Zellen ausschließlich durch Wachstumsfaktoren und Biomaterialien angewandt werden (Kübler, Osteoinduktion und -reparation, Mund-Kiefer-Gesichtschir., 1, 2-25, (1997)).

Durch die Entdeckung und Charakterisierung von immer neuen Faktoren, die Ausreifung und Differenzierung von Körperzellen beeinflussen können, stehen zunehmend Werkzeuge zur Verfügung, die die Herstellung eines vollwertigen Ersatzknorpels oder -knochens, ausgehend von nur wenigen autologen Zellen ermöglichen.

Größter Nachteil dieser Technologie ist jedoch die Notwendigkeit, dem Patienten zunächst eine Gewebeprobe zu entnehmen und die vergleichsweise aufwendige Kultivierung der Zellen.

#### Stammzellrekrutierung, Wachstumsfaktoren

Bei einer natürlichen Gewebeheilung werden normalerweise Zellen aus der Umgebung des Defekts oder der Verletzung angelockt, um die Läsion zu füllen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Vorläuferzellen, die sich erst im weiteren Verlauf durch Differenzierung zu den Gewebezellen mit den jeweiligen typischen Eigenschaften entwickeln. So wandern bei einer Knochenfraktur Vorläuferzellen aus der Knochenhaut und aus dem Knochenmark in den Defekt und bilden über den Umweg eines Knorpelkallusgewebes neue Knochen. Eine natürliche Knorpelregeneration durch einwandernde Vorläuferzellen funktioniert beim Menschen praktisch nicht. Bestimmte Behandlungstechniken wie die Micro Fracture-Verfahren zielen jedoch darauf ab, Zellen aus dem Knochenmark den Weg in den Gelenkraum zu eröffnen.

Auf dem Gebiet der Knorpelheilung sind auch bioaktive Substanzen entwickelt worden, die chemotaktische, antiinflammatorische, antiangiogenetische, differenzierende oder antiadhesive Eigenschaften aufweisen (US 5,853,746: Methods and compositions for the treatment and repair of defects or lesions in cartilage or bone using functional barrier; US 5,817,773: Stimulation, production, culturing and transplantation of stem cells by fibroblast growth factors; US 5,910,489: Topical composition containing hyaluronic acid and NSAIDs).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Substrat zu entwickeln, das sich bei der Heilung und/oder Protektion von Bindegewebe, insbesondere Knorpel, einsetzen läßt. Die Aufgabe wurde durch die Bereitstellung implantierbarer Substrate zur Heilung und/oder Protektion von Bindegewebe, insbesondere zur Knorpelheilung und/oder -protektion bei Arthrose gelöst.

Dabei basiert diese Erfindung insbesondere auf der Nutzung bzw. Stimulation von pluripotenten Vorläuferzellen oder auch mesenchymaler Stammzellen für die Geweberegeneration, deren Potential zur Proliferation und Differenzierung von besonderem Interesse für die Knorpel- oder auch Knochenheilung ist. Vorläufer und Stammzellen können im Prinzip vergleichbar den adulten Zellen eingesetzt werden. Dabei kann man das Differenzierungsverhalten unter Einfluß verschiedener morphogener Faktoren z.B. der FGF (fibroblast growth factor) oder TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta)-Superfamilie unter definierten Kulturbedingungen beeinflussen (US-Patent 5,817,773).

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein implantierbares Substrat zur Heilung und/oder Protektion von Bindegewebe, insbesondere Knorpel, umfassend mindestens ein Mittel zur Aktivierung ortsständiger Zellen zur Geweberegeneration und mindestens eine Struktur für die Zelleinwanderung *in vivo* und/oder für die Zellmatrixbildung und/oder für die Freisetzung von Bestandteilen des eingesetzten Mittels.

Ferner betrifft sie ein Substrat zur Heilung und/oder Protektion von Bindegewebe, insbesondere Knorpel, umfassend mindestens ein Mittel, das differenzierende Faktoren und chemotaktische Faktoren enthält, vorzugsweise zusammen mit einer Struktur, wie oben definiert.

Dabei bezeichnet der erfindungsgemäße Begriff „Substrat“ die Gesamtheit des erfindungsgemäßen Gegenstands. Das erfindungsgemäße Substrat kann z.B. eine

streichbare bzw. klebende "Zell-Lockpaste" oder eine Art "bioaktives Knorpelpflaster" sein. Eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Substrats ist in Figur 1 gezeigt.

5 Der Begriff „Struktur für die Zelleinwanderung *in vivo* und/oder für die Zellmatrixbildung und/oder für die Freisetzung von Bestandteilen des eingesetzten Mittels“ (Struktur) umfaßt die Matrix, in der sich das erfindungsgemäß verwendete Mittel befindet.

10 Der Begriff „Mittel“ umfaßt alle im Rahmen der vorliegenden Erfindung einsetzbaren biologisch aktiven und inaktiven Bestandteile, die in ihrer Gesamtheit zur Aktivierung ortsständiger Zellen zur Geweberegeneration beitragen.

„Chemotaktische Faktoren“ sind biologisch aktive Faktoren, die geeignet sind,  
15 Zellen, z.B. Knorpelvorläuferzellen aus dem Knochenmark, autologe mesenchymale Zellen, Progenitorzellen und Stammzellen, hin zum Ort der Behandlung bzw. an die Stelle, an der das erfindungsgemäße Substrat sich befindet, „anzulocken“.

20 „Differenzierende Faktoren“ sind biologisch aktive Faktoren, die geeignet sind, Zellwachstum, insbesondere der oben genannten Zellen und damit Gewebeaufbau zu induzieren.

Überraschenderweise ist es gelungen, ein Substrat mit Mitteln zur Verfügung zu  
25 stellen, das das Einwandern von Gewebivorläuferzellen aus den umliegenden Geweben - beim Gelenkknorpel also aus dem Knochenmark oder Synovium - induziert und kontrolliert werden kann. Dies geschieht dadurch, daß während der Behandlung die im Substrat enthaltenen Mittel freigesetzt werden.

30 Figur 1 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Substrats, das schichtförmig aufgebaut ist.

Mittel

Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Substrats verwendeten Mittel sind geeignet, das Einwandern von Gewebevorläuferzellen aus den umliegenden Geweben  
5 der zu behandelnden Orte zu induzieren und zu kontrollieren. In der Regel sind die Mittel Substanzen, die zur Mobilisierung und/oder Aktivierung und/oder zum Anlocken autologer mesenchymaler Zellen, Progenitorzellen und Stammzellen geeignet sind. Insbesondere enthalten die Mittel biologisch aktive Faktoren, wie z.B. chemotaktische oder chemotaktische und differenzierende Faktoren. Im einzelnen sind zu nennen:

10 Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, wie z.B. solche aus der TGF-Superfamilie, FGF-Familie, PDGF, IGF, EGF;  
zelluläre Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Integrine, CD44, Selektine, Proteoglykane;  
synthetische Peptide, wie z.B. RGD-Sequenzen, z.B. Argi-  
15 nin-Glycin-Asparaginsäure;  
Zytokine;  
chemotaktische Faktoren, wie z.B. CDMP, CTGF, Osteopontin, NO-Synthese-Hemmer; oder  
extrazelluläre Matrixkomponenten, wie z.B. Proteoglykane, Fibronektin, Kolla-  
20 gen.

Darüberhinaus kann das erfindungsgemäß eingesetzte Mittel – in Abhängigkeit vom Verwendungszweck - folgende weitere Komponenten umfassen:  
Enzyme oder deren Vorstufen, wie z.B. Proteasen, Metalloproteinasen, Cathepsi-  
25 ne;  
Hemmstoffe von Enzymen, wie z.B. THVIP, Antikörper oder synthetische Blocker des katalytischen Zentrums;  
entzündungshemmende Zusätze, wie z.B. entzündungshemmende Arzneimittel und/oder Faktoren.

30



Ferner kann das Mittel auch autologe und nichtautologe Zellen, wie z.B. mesenchymale Zellen, Progenitorzellen, Stammzellen/Vorläuferzellen enthalten, die dann wiederum entsprechende Faktoren freisetzen können.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform können Gene oder bioaktive Faktoren in die Zellen transfiziert werden.

Dabei kann die Freisetzung von zwei oder mehreren Komponenten des erfindungsgemäß eingesetzten Mittels gleichzeitig oder sequentiell und/oder aus zwei  
10 oder mehreren Phasen/Komponenten/Schichten des Substrats bzw. der Struktur erfolgen. Ferner kann das erfindungsgemäß eingesetzte Mittel und/oder die erfindungsgemäß verwendete Struktur Einrichtungen zu einer verzögerten Freisetzung der Komponenten aufweisen.

15 Strukturen

Ferner beinhalten die erfindungsgemäßen Substrate - in einer Ausführungsform zwingend und in einer weiteren Ausführungsform optional - geeignete Strukturen für die Zelleinwanderung *in vivo* und/oder für die Zellmatrixbildung und/oder für die Freisetzung von Bestandteilen des eingesetzten Mittels, insbesondere der darin  
20 enthaltenen Faktoren.

Die erfindungsgemäßen Strukturen für die Zelleinwanderung *in vivo* und/oder für die Zellmatrixbildung und/oder für die Freisetzung von Bestandteilen des eingesetzten Mittels, insbesondere der chemotaktischen und/oder differenzierenden  
25 Faktoren umfassen vorzugsweise  
Hydrogele;  
Schwämme (z.B. aus Kollagen);  
Wolle- oder Watte-artige Gebilde aus Polysacchariden (z.B. Cellulose-Wolle, Cellulose-Watte);  
30 natürliche oder synthetische Polypeptide (Fibrin, Polylysin);

- Geflechte, Gewebe oder Gewirke aus Fasern (z.B. Fasern resorbierbarer Polymere);  
Klebpasten (z.B. Acrylatkleber), Klebefolien (z.B. fibrinogenbeschichteter Hyaluronsäurefolie);  
5 keramische Materialien  
oder eine Kombination aus zwei oder mehr dieser Strukturen.

- Die erfindungsgemäß verwendeten Strukturen - und damit auch die erfindungsgemäßen Substrate - können über resorbierbare oder über nichtresorbierbare Eigenschaften verfügen. Strukturen mit resorbierbaren Eigenschaften umfassen be-  
10 spielsweise Hyaluronsäuren, vorzugsweise solche mit einem Molekulargewicht von 400-600 kD, Poly-alpha-Hydroxysäuren, Kollagene, Alginate, Agarosen, Fibrine, Biogläser oder ihren Kombinationen. Strukturen mit nichtresorbierbaren Eigenschaften umfassen beispielsweise keramische Materialien oder aus Kombi-  
15 nationen von keramischen Materialien mit Strukturen, die resorbierbare Eigenschaften aufweisen.

- Ferner kann das erfindungsgemäße Substrat eine Struktur mit mehreren Unterstrukturen umfassen. Die Unterstrukturen, die die erfindungsgemäß eingesetzten  
20 Mittel bzw. einzelne Bestandteile dieser Mittel speichern und freisetzen können, umfassen Schichten, Tröpfchen/Kügelchen oder Oberflächenbeschichtungen. So ist es beispielsweise möglich, daß innerhalb einer Gitterstruktur aus einem keramischen Material ein Hydrogel umfassend ein erfindungsgemäßes Mittel eingelagert ist.

- 25 Das erfindungsgemäße Substrat kann demnach eine Struktur in Form eines Schwamms, in Form von Beads, Membranen, Gitter, Watten, Beutel/Kissen, als Flüssigkeit, Gel oder als mehrschichtiges Material aufgebaut sein. Im letzteren Falle umfaßt das Substrat dann beispielsweise eine wolleartige Polymerkonstruk-  
30 ten wie z.B. Polyglykolid, kombiniert mit Hyaluronsäure und chemotaktischen Wachstumsfaktoren wie z.B. Osteopontin.

Allgemein weisen die Substrate formbare, streichbare oder pastenartige Eigenschaften mit elastischen oder plastischen mechanischen Eigenschaften auf und sind injizierbar.

5

Das Substrat bzw. die darin befindlichen Strukturen, sofern vorhanden, kann auch mehrere Phasen und/oder Komponenten und/oder Schichten umfassen, die dann wiederum zwei oder mehr Mittel freisetzen können.

- 10 In einer bevorzugten Ausführungsform werden mesenchymale Stammzellen mit Hyaluronsäure vermischt und an den zu behandelnden Ort injiziert.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden mesenchymale Stammzellen mit Hyaluronsäure vermischt und an den zu behandelnden Ort injiziert.

15

- In einer besonderen Ausgestaltungform weisen die Substrate, z.B. in Form eines mehrschichtigen Materials zur Abdeckung der Gelenkfläche, eine Struktur auf, die unterseitig mit Pins, Hohlstiften/-nadeln kombiniert oder mit Verankerungsstrukturen, wie z.B. einen Klettverschluß, versehen ist. Sie können ferner so ausgebildet sein, daß sie unterseitig z.B. knorpelverdauende Enzyme - Metalloproteinasen, 20 Hyaluronidase, Cathepsine - freisetzen. Die Pins, Hohladeln oder Verankerungsstrukturen sind vorzugsweise resorbierbar ausgebildet.

- In einer weiteren Ausführungsform werden mesenchymale Stammzellen und/oder 25 andere Bindegewebsvorläuferzellen, z.B. Periostzellen und Perichondriumzellen mit z.B. Hyaluronsäure in einer Doppelspritze gleichzeitig oder mit getrennten Spritzen nacheinander injiziert.

- Die erfindungsgemäßen implantierbaren Substrate sind mit den Fähigkeiten ausgestattet, autologe mesenchymale Zellen, Progenitorzellen und/oder Stammzellen 30 zu mobilisieren, zu aktivieren und/oder anzulocken und diese Zellen zur Prolife-

ration, Differenzierung und/oder Maturation anzuregen. In die Zellen lassen sich Gene der genannten bioaktiven Faktoren transfizieren.

#### Herstellverfahren

- 5 Die Herstellung des erfindungsgemäßen implantierbaren Substrats zur Heilung und/oder Protektion von Bindegewebe, insbesondere Knorpel, erfolgt durch in Kontakt bringen einer Struktur für die Zellmatrixbildung und/oder Zelleinwanderung *in vivo* und/oder für die Freisetzung von Bestandteilen des eingesetzten Mittels und mindestens eines Mittels zur Aktivierung ortsständiger Zellen zur Gewe-
- 10 beregeneration oder durch in Kontakt bringen von differenzierenden Faktoren und chemotaktischen Faktoren, sofern das erfindungsgemäße Substrat keine Struktur im Sinne der Erfindung umfaßt.

#### Behandlungsverfahren

- 15 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bindegewebsheilung und/oder -protektion, insbesondere bei Arthrose, dadurch gekennzeichnet, daß das Bindegewebe mit einem erfindungsgemäßen Substrat in Kontakt gebracht wird.
- 20 Der Begriff „Bindegewebe“ im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt dabei Knorpel, Knochen, Sehnen und Menisken. In einer bevorzugten Ausführungsform bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Knorpelheilung und/oder -protektion werden vor dem in Kontakt Bringen des Knorpels mit dem Substrat Verbindungskanäle in dem subchondralen Raum des Knorpels hergestellt.
- 25 Bei der Behandlung von z.B. Knorpelheilung und -protektion können derartige Substrate z.B. über die Gelenkfläche mit Fibrin- oder Acrylatkleber geklebt und angepaßt werden. Die verwendeten Fibrin- oder Acrylatkleber sind vorzugsweise mit gespeicherten chemotaktischen Wachstumsfaktoren (cartilage derived
- 30 morphogenetic protein oder connective tissue growth factor) versehen. Sie werden über die Gelenkfläche gestrichen und vorzugsweise mit Thrombin zu einem artifi-

ziellen Supercloth verfestigt. Alternativ umfaßt das erfindungsgemäße Substrat in Form einer Doppelspritze in einer Kammer das erfindungsgemäße Mittel, z.B. differenzierende und/oder chemotaktische Faktoren, und in einer zweiten Kammer das Thrombin. Diese Variante wird insbesondere nach einer Microfracture-  
5 re-Behandlung des zu behandelnden Orts eingesetzt, wobei sich die biologisch aktiven Substanzen (Mittel) in den Supercloth einbringen lassen.

Die Induzierbarkeit des Mittels und/oder die Faktorenfreisetzung erfolgen vorzugsweise von außen, beispielsweise durch Magnetfelder, elektrische Impulse wie  
10 Strom oder Spannung, Bewegung oder Substanz-Injektion.

Die erfindungsgemäßen Substrate werden vorzugsweise nach Erstellen von Kanälen beispielsweise in den subchondralen Raum, beispielsweise durch Mikrofrakturen, Bohrungen, Stiche, eingesetzt. Die Verbindungskanäle/Bohrungen zwischen Markraum und Gelenkraum selbst lassen sich auch durch ein Nagelgitter,  
15 das ein Bestandteil der Struktur sein kann, herstellen, zweckmäßigerweise durch eine klettverschlußartige Verankerungsstruktur mit einem so darunterliegenden Nagelgitter erzeugen.

20 Dieses Verfahren ist in einer bevorzugten Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, daß Verbindungskanäle zwischen Gelenkraum und Knochenmarkraum hergestellt, eine klebrige knorpelfreundliche Schicht auf den arthrotischen Gelenkknorpel gebracht, Zellen aus dem Knochenmark angelockt und in einer temporären nährenden sowie fördernden Umgebung in der aufgeklebten Schicht zu  
25 Knorpelgewebe entwickelt werden. Dabei werden Substrate, die Strukturen mit Kanälen, die geeignet sind, Verbindungen zwischen Gelenkraum und Knochenmarkraum innerhalb vorher hergestellter multipler feiner Bohrungen/Kanäle herzustellen, eingesetzt, mit denen das Einwandern von Gewebevorläuferzellen aus den umliegenden Geweben induziert und Strukturen für die Zellmatrixbildung  
30 ermöglicht werden. Zu dem Verfahren gehört, daß das Substrat Strukturen und/oder Mittel umfaßt, mit denen eine Gelenkfläche, vorzugsweise mehrschich-

tig abgedeckt wird, und so ein Einwachsen und Reifen von Knorpelvorläuferzellen aus dem Knochenmark induzieren.

Das erfindungsgemäße Substrat weist eine Kombination bekannter (mesenchy-  
male Zellen, Progenitorzellen, Stammzellen/Vorläuferzellen aus dem Knochen-  
mark, bioaktive Faktoren) und neuer Elemente (Verbindungskanäle zwischen  
Markraum und Gelenkraum; mehrschichtige Materialien zur Abdeckung der Ge-  
lenkfläche, die ein Einwachsen und Reifen von Knorpelvorläuferzellen aus dem  
Knochenmark induzieren; artifizieller Superclot) auf, die sich gegenseitig beein-  
flussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Vorteil (synergistischen Effekt)  
und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß sich nunmehr Zellen aus  
dem Knochenmark anlocken lassen und sich in dem erfindungsgemäßen Substrat,  
z.B. in den mehrschichtigen Substraten zur Abdeckung der Gelenkfläche zu  
Knorpelgewebe entwickeln. Durch das erfindungsgemäße Substrat ist es möglich,  
die externe Züchtung und anschließende Transplantation der gezüchteten Zellen in  
den Patienten zu minimieren, vorzugsweise zu ersetzen.

Die erfindungsgemäße Verwendung der Substrate besteht in ihrem Einsatz in der  
operativen Medizin und im Tissue Engineering, insbesondere bei der Knorpel-  
heilung und -protektion bei Arthrose sowie in ihrem Einsatz zur Proliferation,  
Differenzierung und Maturation von Zellen.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

25

## Beispiele

### Beispiel 1

Zur Behandlung einer ausgeprägt arthrotisch deformierten Gelenkoberfläche wer-  
den zunächst durch multiple feine Bohrungen (1-2 mm) kleine Verbindungen zwi-  
schen dem Knochenmarkraum und der Gelenkhöhle hergestellt. Anschließend

wird ein wolleartiges Polymerkonstrukt (Polyglykolid) kombiniert mit Hyaluronsäure und chemotaktischen Wachstumsfaktoren (Osteopontin) über die Gelenkfläche mit Fibrin- oder Acrylatkleber geklebt und angepasst.

5 Beispiel 2

Zur Behandlung der Gelenkfläche aus Beispiel 1 wird nach Herstellen der Öffnungen in den Markraum Fibrinkleber mit gespeicherten chemotaktischen Wachstumsfaktoren (cartilage derived morphogenetic protein oder connective tissue growth factor) über die Gelenkfläche gestrichen und mit Thrombin verfestigt (artifizieller Supercloth).

Abkürzungsverzeichnis

- CD44 - cluster of differentiation  
CDMP - cartilage derived morphogenetic protein  
15 CTGF - connective tissue growth factor  
EGF - epidermal growth factor  
FGF - fibroblast growth factor  
IGF - insulin-like growth factor  
NO-Synthase-Hemmer - Stickoxid-Synthase-Hemmer  
20 NSAID - non-steroidal-anti-inflammatory drugs  
PDGF - platelet derived growth factor (von Thrombozyten gebildeter Wachstumsfaktor)  
RGD-Sequenzen - Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Sequenzen  
PVC - Polyvinylchlorid  
25 TGF- $\beta$ -Superfamilie - transforming growth factor beta superfamily TIMP - tissue inhibitor of metallo proteinases.

Bezugszeichenliste

- 1: aufgebrachte Substanz
- 2: Verbindungskanäle zum Knochenmark
- 3: Wanderung der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark
- 5 4: Freisetzung bioaktiver Faktoren
- 5: mesenchymale Zellen, ggf. gentechnisch modifiziert
- 6: Partikel mit bioaktiven Faktoren
- 7: Abdeckschicht
- 8: Schicht mit differenzierenden bzw. gewebebildenden Faktoren
- 10 9: Schicht mit chemotaktischen Faktoren



**Patentansprüche**

1. Implantierbares Substrat zur Heilung und/oder Protektion von Bindegewebe,  
5 vorzugsweise Knorpel, umfassend mindestens ein Mittel zur Aktivierung orts-  
ständiger Zellen zur Geweberegeneration und mindestens eine Struktur für die  
Zelleinwanderung *in vivo* und/oder für die Zellmatrixbildung und/oder für die  
Freisetzung von Bestandteilen des eingesetzten Mittels.
- 10 2. Substrat nach Anspruch 1, wobei das mindestens ein Mittel chemotaktische  
Faktoren oder differenzierende Faktoren und chemotaktische Faktoren enthält.
3. Implantierbares Substrat zur Heilung und/oder Protektion von Bindegewebe,  
vorzugsweise Knorpel, umfassend mindestens ein Mittel, das differenzierende  
15 Faktoren und chemotaktische Faktoren enthält.
4. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es  
mindestens ein abdeckendes Material umfaßt.
- 20 5. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die  
Strukturen mindestens einen Bestandteil (a) bis (g) umfassen:
  - (a) Hydrogele
  - (b) Schwämme, Kollagen-Schwämme
  - (c) Wolle/Watte aus Polysacchariden, Cellulose-Wolle, Cellulose-Watte
  - 25 (d) natürliche oder synthetische Polypeptide, Fibrin, Polylysin
  - (e) Geflechte, Gewirke oder gewebte Strukturen aus Fasern, vorzugsweise Fa-  
sern umfassend resorbierbare Polymere
  - (f) Klebpasten, Acrylatkleber, Klebefolien, fibrinogenbeschichtete Hyalu-  
ronsäurefolie, oder

(g) keramische Materialien.

6. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das  
mindestens ein Mittel einen biologisch aktiven Faktor enthält, der ausgewählt  
5 wird aus der Gruppe bestehend aus:  
Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, zellulären Adhäsionsmolekülen,  
synthetischen Peptiden, Zytokinen, chemotaktischen Faktoren und extrazellu-  
läre Matrixkomponenten.
- 10 7. Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es  
ferner eine Verankerungsstruktur zur Verankerung des Substrats in oder auf  
dem zu behandelnden Ort umfaßt.
8. Verfahren zur Herstellung implantierbarer Substrate zur Heilung und/oder  
15 Protektion von Bindegewebe, vorzugsweise Knorpel, nach den Ansprüchen 1  
bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Struktur für die Zellmatrixbildung  
und mindestens ein Mittel zur Aktivierung ortsständiger Zellen zur Gewebe-  
regeneration in Kontakt miteinander gebracht werden oder daß differenzieren-  
de Faktoren und chemotaktische Faktoren miteinander in Kontakt gebracht  
20 werden.
9. Verfahren zur Bindegewebsheilung und/oder -protektion, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß das Bindegewebe mit einem Substrat gemäß einem der Ansprü-  
che 1 bis 7 oder einem Substrat, herstellbar gemäß dem Verfahren nach An-  
25 spruch 8 in Kontakt gebracht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Bindegewebe  
Knorpel ist und vor dem in Kontakt Bringen des Knorpels mit dem Substrat  
Verbindungskanäle in dem subchondralen Raum des Knorpels hergestellt  
30 werden.

11. Verwendung eines Substrats gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder eines Substrats, herstellbar gemäß dem Verfahren nach Anspruch 8 in der operativen Medizin und im Tissue Engineering.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11735

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/18 A61F2/30 A61L27/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K A61F A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 33415 A (GLANCY TODD P ;PETERSON DALE R (US); DEPUY ORTHOPAEDICS INC (US);) 8 July 1999 (1999-07-08) page 8, line 4 -page 9, line 16 claims	1-11
X	US 5 837 258 A (GROTENDORST GARY R) 17 November 1998 (1998-11-17) claims	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 April 2001

Date of mailing of the international search report

02/05/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thornton, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/11735

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9933415 A	08-07-1999	AU 2021499 A EP 1043963 A	19-07-1999 18-10-2000
US 5837258 A	17-11-1998	US 5770209 A US 5585270 A US 5408040 A AU 722919 B AU 5885596 A AU 720268 B AU 5958296 A BR 9608558 A BR 9609521 A CA 2222509 A CA 2222609 A CN 1195295 A CN 1191491 A EP 0831903 A EP 0831885 A JP 11507332 T JP 11506449 T US 6150101 A US 6069006 A WO 9638172 A WO 9638168 A US 6190884 B US 6149916 A US 5916756 A US 5783187 A	23-06-1998 17-12-1996 18-04-1995 17-08-2000 18-12-1996 25-05-2000 18-12-1996 30-11-1999 15-06-1999 05-12-1996 05-12-1996 07-10-1998 26-08-1998 01-04-1998 01-04-1998 29-06-1999 08-06-1999 21-11-2000 30-05-2000 05-12-1996 05-12-1996 20-02-2001 21-11-2000 29-06-1999 21-07-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Patentsymbol  
PCT/EP 00/11735

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 A61K38/18 A61F2/30 A61L27/22		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoffe (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 A61K C07K A61F A61L		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 33415 A (GLANCY TODD P ;PETERSON DALE R (US); DEPUY ORTHOPAEDICS INC (US);) 8. Juli 1999 (1999-07-08) Seite 8, Zeile 4 -Seite 9, Zeile 16 Ansprüche	1-11
X	US 5 837 258 A (GROTENDORST GARY R) 17. November 1998 (1998-11-17) Ansprüche	1-11
<input type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 17. April 2001		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 02/05/2001
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Thornton, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Patenzzeichen

PCT/EP 00/11735

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9933415 A	08-07-1999	AU 2021499 A	19-07-1999
		EP 1043963 A	18-10-2000
US 5837258 A	17-11-1998	US 5770209 A	23-06-1998
		US 5585270 A	17-12-1996
		US 5408040 A	18-04-1995
		AU 722919 B	17-08-2000
		AU 5885596 A	18-12-1996
		AU 720268 B	25-05-2000
		AU 5958296 A	18-12-1996
		BR 9608558 A	30-11-1999
		BR 9609521 A	15-06-1999
		CA 2222509 A	05-12-1996
		CA 2222609 A	05-12-1996
		CN 1195295 A	07-10-1998
		CN 1191491 A	26-08-1998
		EP 0831903 A	01-04-1998
		EP 0831885 A	01-04-1998
		JP 11507332 T	29-06-1999
		JP 11506449 T	08-06-1999
		US 6150101 A	21-11-2000
		US 6069006 A	30-05-2000
		WO 9638172 A	05-12-1996
		WO 9638168 A	05-12-1996
		US 6190884 B	20-02-2001
		US 6149916 A	21-11-2000
		US 5916756 A	29-06-1999
		US 5783187 A	21-07-1998



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**